

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-169053

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)7月25日

G 01 N 33/50
// C 12 Q 1/00E-8305-2G
8412-4B

審査請求 有 発明の数 3 (全10頁)

⑮ 発明の名称 過酸化活性物質測定のための安定試験組成物及び試験具並びに該試験具の製造方法

⑯ 特 願 昭62-1965

⑰ 出 願 昭62(1987)1月9日

優先権主張 ⑱ 1986年1月16日 ⑲ 米国(US) ⑳ 819282

㉑ 発 明 者 イブラヒム・エー・イ アメリカ合衆国、インディアナ 46615、サウス・ベンド、
スメイル マンチエスター・ドライブ 1144

㉒ 発 明 者 テレサ・イツプ アメリカ合衆国、インディアナ 46514、エルクハート、ク
リークハブン・ドライブ 51194

㉓ 出 願 人 マイルス・ラボラトリ アメリカ合衆国、インディアナ 46515、エルクハート、ミ
ーズ・インコーポレー ルトル・ストリート 1127
テツド

㉔ 代 理 人 弁理士 津 国 隆

明 細 書

1. 発明の名称

過酸化活性物質測定のための安定試験組成物
及び試験具並びに該試験具の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. モル比約0.9ないし約3.0の1,4-ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシドとベンジジン指示薬とからなることを特徴とする、試料中の過酸化活性物質の測定のための安定試験組成物。

2. 更に増強剤を含有する特許請求の範囲第1項記載の安定試験組成物。

3. 増強剤が4-メチルキノリン及び8-メトキシキノリンから選ばれる特許請求の範囲第2項記載の安定試験組成物。

4. 更にpHを約4ないし7.5の範囲にしうる緩衝剤を含有する特許請求の範囲第2項記載の安定試験組成物。

5. ベンジジン指示薬が3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンである特許請求の範囲

第4項記載の安定試験組成物。

6. 人体からの試料100万部において少なくとも1部のヘモグロビンの存在に感受性を有する、安定試験具であって、

a) キャリアマトリックス、及び

b) それに包含せしめられる、モル比が約0.9ないし約3.0の1,4-ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシドとベンジジン指示薬、増強剤及びpHを約4ないし約7.5の範囲にしうる緩衝剤からなる試験組成物

からなることを特徴とする安定試験具。

7. 試験組成物にアスコルビン酸塩耐性を付与することができる第二鉄キレートをも更に含有する特許請求の範囲第6項記載の安定試験具。

8. 第二鉄キレートがN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の第二鉄キレートであり、緩衝剤がpHを約6.5ないし約7.1にすることが可能な特許請求の範囲第7項記載の安定試験具。

9. 緩衝剤が、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン-マロン酸と磷酸トリエタノールアミンとのモル比約1:3の組合わせである特許請求の範囲第8項記載の安定試験具。

10. 更にポリビニルピロリドンを含む特許請求の範囲第9項記載の安定試験具。

11. 体液試料100万部につき少なくとも1部のヘモグロビンの存在に感受性を有する、アスコルビン酸塩耐性の安定試験具の製造方法であって、

- a) 試験具にアスコルビン酸塩耐性を付与することができる第二鉄キレートとpHを約6.5ないし約7.1の範囲に仕うる緩衝剤とを含む第1の溶液を製造し、
- b) 有機溶媒：モル比が約1.6ないし3.0の1,4-ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシド及びベンジジン指示薬：並びに増強剤から成る第2の溶液を製造し、
- c) キャリアマトリックスに第1又は第2の溶液を含浸させ、

【発明の技術分野】

本発明は一般の水性流体中の過酸化的に活性な物質(過酸化活性物質)を測定するための安定組成物及び特に尿中の潜血を測定するための安定試験具に関する。

【実用性】

ヘモグロビン及びその誘導体は酵素であるペルオキシダーゼと同様の挙動を示すので、「過酸化活性」物質の代表例として挙げられる。そのような物質は、ペルオキシドと、ベンジジン、o-トリジン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、2,7-ジアミノフルオレンのような指示薬化合物又は同様の物質との酸化還元反応を触媒し、それにより色変化を引き起こすことから、偽ペルオキシダーゼつまり酵素様物質とも呼ばれている。過酸化活性物質の試験は尿のような体液試料及び便中のしばしば「潜」血と呼ばれる少量の血液の検出に特に有用である。尿及び便における血液の存在は癌をはじめとする種々の異常な状態によって起こされる出血を示すもので

d) 溶液を含浸したキャリアを乾燥し、

e) 乾燥したキャリアに、第1又は第2溶液の先に含浸させなかった方を含浸させ、

f) 2種類の溶液を含浸させたキャリアを乾燥する、

工程からなることを特徴とする方法。

12. 第二鉄キレートがN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の第二鉄キレートである特許請求の範囲第11項記載の方法。

13. 緩衝剤が、モル比が約1ないし3のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-マロン酸とホウ酸トリエタノールアミンとの組合わせである特許請求の範囲第12項記載の方法。

14. 増強剤が4-メチルキノリン及び8-メトキシキノリンから選ばれる特許請求の範囲第11項記載の方法。

15. 有機溶媒がエタノール、メトキシプロパノール及びジメチルホルムアミドから選ばれる特許請求の範囲第11項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

ある。かかる状態を初期に診断することが重要であるため、潜血の試験手段は通常複数の試験パッドで構成された試験具に含まれている。各パッドは異なる分析対象物の検査に適した試薬を含むため、ここでは多種(数)試験具又は「マルチプル」("multiples")と呼び、日常の身体検査における尿試料の選別に使用される。また一般に、大部分の多種選別試験具にはペルオキシダーゼに基づくグルコース測定が含まれる。

沃化カリウム指示薬系を用いるグルコース試験手段を、基質としてヒドロペルオキシドを含む潜血試験手段とともにマルチプル上に置き、得られたマルチプルをびんに入れ、保存及び/又は輸送する場合に問題が認められた。これらの試験手段に一般に使用されるヒドロペルオキシド、特にクメンヒドロペルオキシド、2,5-ジメチルヘキサノ-2,5-ジヒドロペルオキシド及びp-ト-ブチルクメンヒドロペルオキシドが保存及び取り扱い中に揮発及び/又は分解したり、びんに密封されている間にグルコース試験手段中

の沃化カリウムと反応して「緑変」するか又は偽りの陽性反応を引き起こすことは明らかである。本発明はかかる問題を解決した。

【情報の開示】

潜血試験手段は当業界で周知であり、一般にヘモグロビンの基質としてのヒドロペルオキシド、色原体及び反応の安定剤又は促進剤の使用に基づくものである。

米国特許第3,853,471号はヒドロペルオキシド、色原体及び安定剤としてリン酸又はホスホン酸を含有するキャリアで構成される試験片を開示している。ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシドが有用な基質として開示されている。

米国特許第3,975,161号は有機ヒドロペルオキシド又はその塩、酸性緩衝剤、色原体、湿潤剤、天然又は合成の固体ポリマーフィルム形成物質及び新規な促進剤を含有する組成物を含浸せしめた吸水性キャリアからなる試験片を開示している。上記促進剤はイソキノリン又はその誘

導したキャリアマトリックスで形成され、試験組成物は更に増強剤及び約4ないし約7.5の範囲のpHを与える緩衝剤を含む。第二鉄キレートを含むことにより、試験具にアスコルビン酸塩耐性が付与される。試験具はグルコース酸化酵素、ペルオキシダーゼ及び沃化カリウム指示薬の使用に基づき、緑変の問題の徴候なく、グルコースの測定を行うこともできるマルチプルの製造に使用できる。

【発明の説明】

本発明の安定組成物は試料中の過酸化活性物質の存在を測定するために使用することができる。過酸化活性物質を含有すると推定される水性流体試料又は水性流体に溶解しうる試料であれば、どのようなものでも検査することができる。試験組成物は、尿のような体液又は便に関して特に有用である。最も有用な実施態様の1つは尿における使用を意図する潜血用固体試験具である。尿潜血試験手段は1つの試薬パッドとして多種試験具上に存在せしめて特に有用である。また、そのよう

な試薬パッドの1つである。ヒドロペルオキシドはクメンヒドロペルオキシド、パラメタンヒドロペルオキシド、1,4-ジイソプロピルベンゼン-1,4-ジヒドロペルオキシド、2,5-ジメチルヘキサ-2,5-ジヒドロペルオキシド又は1-ヒドロキシシクロヘキサ-1-ヒドロペルオキシドからなる群より選ばれることが開示されている。

キノリンの酸性塩又は付加物及びその誘導体は過酸化活性物質の検出のための試験組成物における相乗作用剤として米国特許第3,986,833号に開示されている。

【発明の概要】

本発明はモル比が約0.9ないし約3.0の1,4-ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシド及びベンジジン指示薬からなることを特徴とする、試料中の過酸化活性物質の測定のための安定試験組成物を提供するものである。

尿試料100万部中の1部の潜血の存在に感受性を有する安定試験具は試験組成物を包含せし

めた多種試験具は通常少なくともグルコース測定手段をも含んでいる。種々のマルチプルがインディアナ州エルクハートのマイルス・ラボラトリーズ社のエイムズ・ディビジョン(Ames Division of Miles Laboratories, Inc., Elkhart, IN)よりマルチスティックス(MULTISTIX®)試験片及びN-マルチスティックス(N-MULTISTIX®)試験片の商標名で市販されている。

【問題点】

グルコース測定手段及び潜血試験手段の両者を含む前記マルチスティックス及びN-マルチスティックスの組成は、消費者の使用に先立つ輸送及び/又は保存中に、グルコース用試薬パッドの「緑変」として知られる現象を示すことが判明している。グルコース測定は、グルコースを含有する試料と接触せしめた後のグルコース酸化酵素による過酸化水素の発生及びそれに続く、発生した過酸化水素のペルオキシダーゼの存在下に視認可能な色を発する沃化カリウム指示薬系による測定に基づくものである。グルコース用パッドの

「緑変」は消費者が使用にあたって試薬片のびんを開ける前にもペルオキシダーゼ/沃化カリウム系との何らかの反応が起きたことを示すものであった。この現象は保存及び輸送中のマルチプル上の溶血試験手段において有機ヒドロペルオキシド基質の分解及び/又は揮発によって生じるものと思われる。

そのようなマルチプルを市販するためには、輸送及び流通を見込んだ十分な貯蔵寿命及び顧客のために妥当な有効寿命が必要である。「緑変」が生じると陰性応答を示すはずの試料において、デシリッター当たり30ミリグラム(mg/dl)のグルコースの陽性応答を示すものと解釈され得る。従って、そのような使用前の「緑変」は許容されない。

(解決方法)

臨床的に有用な溶血試験手段は尿100万部中の1部のヘモグロビン(溶血)に対しても感受性を有するものでなければならない。十分な感受性及び安定性をもたらす、多種試験具上の他の試

ンを用いた、尿中溶血測定用試験具の組成を最適化することにより、目的とする応答を得るためにはジヒドロペルオキシドとベンジジン指示薬の間に一定範囲のモル比を維持しなければならないことがわかった。一定範囲のモル比はベンジジン指示薬1モルにつきジヒドロペルオキシドが約0.9ないし約3.0モル、好ましくはベンジジン指示薬1モルにつきジヒドロペルオキシドが約1.6ないし3.0モルであった。このモル比の範囲を下まわると必要な感受性が得られず、このモル比を上まわると、置くべきことに試薬パッドはヘモグロビンに対し明確な反応性を示さなかった。

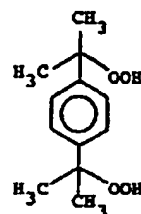
試験組成物

過酸化活性物質の測定のための安定試験組成物は、ベンジジン指示薬に対しジヒドロペルオキシドと同様の一定範囲のモル比を必要とする。組成物は50℃で4週間の熱をかける条件に対し安定している、つまり活性を保持する。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン

系試験手段に影響を及ぼさない唯一のヒドロペルオキシドが見出された。

1,4-ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシド。

1,4-ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシド(DBDHと省略し、本文中では「ジヒドロペルオキシド」と称するが、 α, α' -ジヒドロペルオキシ-1,4-ジイソプロピルベンゼンと呼ぶこともできる)は、次式:



を有し、DBDHは不揮発性、非昇華性化合物であることがわかった。他のヒドロペルオキシド類とは異なり、種々の条件下で非揮発性であることが認められ、従って大量に製造し保存することが可能であった。

3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン

は好ましい指示薬であるが、他のベンジジン指示薬を使用することもできる。好適なベンジジン指示薬としては、テトラエチルベンジジン、*o*-トリジン、ベンジジン、*o*-ジアニシジン等が挙げられる。

試料100万部中の1部の過酸化活性物質に対する感受性は、組成物中に増強剤を包含せしめることにより得られる。過酸化活性物質の測定のための当業界で公知の増強剤を使用することができる。かかる増強剤としてはキノリン類及びその誘導体並びにイソキノリン類及びその誘導体が挙げられる。増強剤は、好ましくは、イソキノリン、4-プロモイソキノリン、4-メチルキノリン、6-メトキシキノリン、3-アミノキノリン又は5,6-ベンゾキノリンであってもよい。この群の中でもキノリン類、4-メチルキノリン及び6-メトキシキノリンが好ましく、4-メチルキノリン〔商標名 レビジン(Lepidine®)としてウィスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッヒケミカル社(Aldrich Chemical Co., Milwaukee,

VI)より市販]が最も好ましい。

試験試料の酸性度又は塩基性が高い場合、試験組成物は緩衝化すべきである。緩衝剤は、pHを約4.0ないし約7.5の範囲とすることができるものから任意に選択される。リン酸塩、クエン酸塩等の緩衝剤又はそれらを組合せたものを使用して適切なpH範囲とする。

試験具

上記の試験組成物をキャリアマトリックスに包含せしめ、乾燥することにより便利な乾燥試薬試験のフォーマット(format)が得られる。

試験具は人体からの試料の選別に特に好都合なフォーマットである。人体からの試料100万部につき少なくとも1部のヘモグロビンの存在に感受性を有する安定試験具はキャリアマトリックスに、DBDHとベンジジン指示薬とを、モル比が約0.9〜約3.0にて、更に、増強剤及びpHを約4ないし7.5の範囲にしうる緩衝剤を包含せしめることにより製造することができる。有用なベンジジン指示薬、増強剤及び緩衝剤は先に述

べた。安定試験具は100℃で4週間保存した後に正確な試験結果を提供する試験具の能力によってその範囲が限定される。色応答が本来のカラーブロックの応答とは異ならないと判定された場合は、目視的に読取った試験結果は正しいと言える。このことは、「2分の1未満のカラーブロックにおける色の減退」と呼ばれることがあり、使用者に提供された適切なカラーチャート上の色ブロックに言及するものである。着色の「2分の1のカラーブロック」以内の色応答は分析対象物の正確な量として読み取られる。ヘモグロビン(増血)の臨床的選別に有用な感受性は100万につき1部であると決められている。体液試料は通常望ましい範囲外のpHを有しているため、緩衝剤が試験組成物に添加される。

市販の使用可能な尿増血試験具は3つの主な属性、つまり安定性、感受性及びアスコルビン酸の影響に対する耐性を有していなければならない。安定性及び感受性の必要条件については既に定義した。1:1,000,000の感受性は尿1

デシリットル当たり0.15mgのヘモグロビンに相当する。アスコルビン酸の影響は業界公知である。アスコルビン酸は指示薬の酸化を妨げ、見掛け上は陰性の結果をもたらす。「アスコルビン酸塩耐性」はここでは、尿試料が試料1デシリットルにつき50ミリグラム程度のアスコルビン酸を含有する場合に観察される指示薬の色に対する無視し得る妨害を意味するものとして定義する。アスコルビン酸又はアスコルビン酸塩は酸化還元指示薬系に基づく診断試験に対する共通の妨害物であり、日常ビタミンCを摂取する人々の試験を行なう場合には特に重大である。

試験組成物に第二鉄キレートを添加することにより、試験具にアスコルビン酸塩による妨害に対する耐性を付与することができる。使用可能な第二鉄キレートとしては、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸(Fe-HEDTA)、エチレンジアミンテトラ酢酸(Fe-EDTA)、シクロヘキシレンジアミンテトラ酢酸(Fe-CDTA)、ニトリロ

三酢酸(Fe-NTA)、イミノジ酢酸(Fe-IMDA)、エチレンジアミンジ酢酸ジプロピオン酸(Fe-EDDP α 及び β 型)、ヒドロキシエチルイミノジ酢酸(Fe-HIMDA)の第二鉄キレートのようなポリカルボキシアalkylアミン第二鉄キレート類及びその混合物が挙げられる。好ましくはFe-HEDTA及びFe-EDTAであり、最も好ましくはFe-HEDTAである。ポリカルボキシアalkylアミン第二鉄キレートは米国特許願第575,725号にさらに詳細に記載されており、参考例としてここに取り上げる。

スが最も良くなることが判明した。試験を行なった250を上まわる緩衝剤の組合せの中でも、モル比が1ないし3のトリスー（ヒドロキシメチル）アミノメタンマロン酸と磷酸トリエタノールアミンの併用により尿試験について最良の結果が得られることが判明した。リン酸塩、クエン酸塩又はコハク酸塩等の他の緩衝剤及び緩衝剤の組合せを使用することができる。しかしながら、その場合には、感受性、安定性又はアスコルビン酸塩耐性が多少損なわれる。

縮合剤、色安定剤、界面活性剤等のような他の成分を添加することができる。ポリビニルピロリドンのようなポリマーを加えることにより安定性及び試験具上の発色の均一性が上昇する。

キャリアマトリックス

キャリアマトリックスは、試験組成物に対して実質的に不活性で、多孔質であり及び／又は試験すべき水性試料に対して吸収性である限り、試験組成物の成分を包含せしめることが可能ないかなる物質であってもよい。「キャリアマトリック

前記の潜血試験手段はキャリアマトリックスに全試験成分を含有する単一の溶液を含浸させ、上記マトリックスを乾燥させることにより製造された。通常紙を試薬含有溶液に浸漬することにより紙製キャリアへの試薬の含浸を行った。現在でもその方法を使用して一般の過酸化活性物質の測定のための試験具を製造することができる。しかしながら、第二鉄キレートとしてFe-HEDTAを含有する好ましい試験具は2段階の含浸工程により製造される。

好ましい試験具の製造方法は次の工程を含む：

a) 試験具にアスコルビン酸塩耐性を付与することができる第二鉄キレート及びpHを約6.5ないし約7.1の範囲とすることができる緩衝剤を含有する第1の溶液を製造し、

b) 有機溶媒；モル比約0.9ないし3.0の1,4-ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシド及びベンジジン指示薬；並びに増強剤を含有する第2の溶液を製造し、

ス」という表現は水又は他の生理的液体と接触せしめた場合、不溶性であり、その構造的-一体性を維持する吸収性又は非吸収性マトリックスを意味する。使用可能な適切な吸収性マトリックスとしては、紙、セルロース、木材、合成樹脂フリース、織布及び不織布等が挙げられる。紙は好ましいキャリアマトリックスである。非吸収性マトリックスとしては、グラスファイバー、ポリマーフィルム、予備成形された又は微細孔質の膜及びポリプロピレンのような有機プラスチック材料等が挙げられる。

試薬の導入は浸漬、塗布又は吹付けのようなどのような方法によっても行なうことができる。好ましい方法は紙を試薬溶液に浸漬して含浸を行い、溶媒を乾燥により除去することである。乾燥は包含せしめた試薬に有害な影響を与えない方法であればいかなるものによっても行なうことができるが、通常空気乾燥オープンによって行なわれる。

製造方法

c) キャリアマトリックスに第1又は第2の溶液を含浸させ、

d) 溶液を含浸させたキャリアを乾燥し、

e) 乾燥したキャリアに、第1又は第2の溶液の、先に含浸させなかった方を含浸させ、

f) 2種類の溶液を含浸させたキャリアを乾燥する。

第1の溶液は50%未満の有機溶媒を含有するのに対し、第2の溶液は50%を超える、好ましくは70ないし80%の有機溶媒を含有する。どちらの含浸工程にも適した有機溶媒としてはジメチルホルムアミド、エタノール及びメトキシプロパノールが挙げられる。

DBDHのベンジジンに対するモル比の好ましい範囲は1.8ないし3.0である。DBDHのベンジジンに対するモル比は第2の含浸溶液を製造するために使用された化合物の量から計算された。乾燥された試験具におけるモル比は、紙を乾燥する間の少量（約10%）のDBDHの損失、すなわち分解のため多少低くてもよい。更にポ

リビニルピロリドンのような成分を、最も都合のよいようにどちらかの溶液に包含せしめることができる。

得られた2度の含浸及び乾燥を行った紙を切断し、ポリスチレンのような硬質ポリマーの基材に貼付する。その他の基材は周知である。得られた試験具は便宜上防水性の持ち手に貼付された小さい矩形の試薬パッドから成る。多種試験具においては、グルコース、蛋白質、pH、比重及び白血球のような種々の診断試験手段を含む他の試薬パッドを更に設けることができる。特に本発明の試薬パッドは、ペルオキシダーゼ/沃化カリウム指示薬系を含むグルコース試薬パッドを備えた多種試験具において使用することができる。

使用法

試験組成物は直接水性試験試料により又は試料と接触せしめる前に水を加えることにより溶液を形成して使用することができる。試験具は体液試料を接触させ、試験具を取り出し、発生した色を目視又は機械により測定することによって有利に

使用される。通常、読み取り試験は、使用者に提供されている専用のカラーチャートと比較することにより半定量的濃度範囲を与える機械による結果の方がややより定量的であり、インディアナ州、エルクハートのマイルスラボラトリーズ社エイムズ・ディビジョンより入手可能なクリニテック (CLINITEX®) 10 反射光度計のような装置を用いることにより得られる。尿試料中への浸漬による潜血試験の結果は、通常、目視又は機械により読み取りにおいては、約1分未満で得られる。マルチプルの機械的読み取りの方が長い読み取り時間を要する他の試薬試験が含まれているため長い時間を要する。

【略語】

次の略語を便宜上使用する。実施例で使用する化学薬品の正式名は表記の通りである。

M	モル
mM	ミリモル
mg	ミリグラム
dL	デシリットル

DBDH	1, 4-ジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシド
%	パーセント、特に明記しない限り容量/容量
°C	摂氏温度
PVP K30	ポリビニルピロリドン 分子量 40,000 ニューヨーク州、ニューヨークのGAF社 (GAF Corp., New York, N.Y.) より市販
レビジン (Lepidine)	4-メチルキノリン ウィスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッチケミカル社より市販
SSD	標準液表示単位
Fe-HEDTA	N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸第二鉄
SG	比重
トリス	トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン
ビス-トリス	1, 3-ビス [トリス (ヒドロキシメチル) メチルアミノ] プロパン
HEPES	N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-エタンスルホン酸

TEB 硫酸トリエタノールアミン

トリス-マレイン酸塩 トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン-マレイン酸

トリス-マロン酸塩 トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン-マロン酸

次の実施例で行なった実験について説明する。実施例は発明を説明するためのものであって、それらは発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。その範囲は特許請求の範囲によってのみ限定される。当業者は組成物の成分及び反応パラメーターを望ましいと思われる様に变化させたり、代用物を用いたり、変更させることができる。

【実施例】

実施例1：好ましい実施態様

尿試料100万部に対し1部の潜血の存在に感受性を有する安定なアスコルビン酸塩耐性試験手段を下記の通り2段階の含浸工程により製造した。

第1の合浸液は下記の化合物の水性混合物を含有していた。

トリス-マロン酸塩	0.1M
磷酸トリエタノールアミン	0.3M
ドデシルスルホン酸ナトリウム	0.3重量%
Fe-HEDTA	5mM

上記の水性混合物のpHを6.80から8.82の間に調整した後ジメチルホルムアミド(最終溶液はジメチルホルムアミドを45%含有)で希釈した。ホアットマン(Whatman®)3MM紙を上記水溶液に浸漬し85℃で5分間乾燥した。

次に、乾燥した紙を：

3,3',5,5'- テトラメチルベンジジン	25-35mM
4-メチルキノリン	0.6容量%
PVP K30	4重量%
DBDH	45-60mM
ジメチルホルムアミド	80容量%
エチルオレンジ	25mg/dL
橙色G染料	25mg/dL

表 1

ヒドロペルオキシド	注 記
クメンヒドロペルオキシド	反応性を有するがマルチプル上のグルコース試験手段を侵襲させる
1,4-ジイソプロピルベンゼンモノヒドロペルオキシド	反応性を有するがマルチプル上のグルコース試験手段を侵襲させる
p-トールチルイソプロピルベンゼンヒドロペルオキシド	反応性を有するがマルチプル上のグルコース試験手段を侵襲させる
2,5-ジメチルヘキサノ-2,5-ジヒドロペルオキシド	反応性を有するがマルチプル上のグルコース試験手段を侵襲させる
2-(α -ヒドロペルオキシイソプロピル) 6-イソプロピルナフタレン	低反応性
2,8-ジ-(α -ヒドロペルオキシイソプロピル) ナフタレン	非反応性
p-(α -ヒドロペルオキシイソプロピル) 安息香酸	不適切、血液の存在下にも反応する(偽りの陽性反応)
p-イソプロピルベンゼンスルホン酸ヒドロペルオキシド	非反応性

を含有する第2合浸液に浸漬した。試験によってこの配合物が市販に適する尿潜血試験手段としてすべての要求条件に合うことが示された。

実施例2：不適切なヒドロペルオキシド

下記の表1は実施例1の配合物中のDBDHの代わりに使用し、不適切であることが判明した多数の他のヒドロペルオキシドを示す。

実施例3：不適切な緩衝剤

緩衝剤系はpH及び比重に影響を与える尿に対する耐性に加えその他の必要な特性を有する市販に適する尿潜血用乾燥試薬試験具を提供するためには重要であることがわかっている。実施例1の配合物を緩衝剤を変化させて使用し、尿潜血用単一パッド試験具を用いて試験を行なった。次表の一部に紙製キャリアに含浸させたDBDH/Fo-HEDTA試験配合物と共に用いた緩衝剤の組み合わせリストを挙げる。

緩衝剤系

緩衝剤系	結 果
ビストリス, pK 6.5	尿のpH又はSG変動に耐性なし
HEPES, pK 7.6	試験片は反応性を有さず
イミダゾール, pK 7.0	—製造中に指示薬が反応した —ヘモグロビンに反応しない
イミダゾールとトリス (pK 8.3)	—製造中に指示薬が反応した —ヘモグロビンに反応しない
リン酸塩, pK 6.9	アスコルビン酸塩耐性の必要条件に 不適合
クエン酸塩とリン酸塩	アスコルビン酸塩耐性の必要条件に 不適合
トリスとマレイン酸塩 (pK ₂ = 6.2)	アスコルビン酸塩耐性の必要条件に 不適合 pH/SG変動に対する性能が低い
マレイン酸塩とTEB	紙に汚点発生
トリス/マレイン酸塩/ TEB	安定性の必要条件に不適合
マロン酸塩/TEB (トリス不使用)	応力処理後アスコルビン酸塩耐性が 消失
クエン酸-クエン酸ナトリ ウム 過酸トリエタノールアミン pH=6.5	アスコルビン酸塩耐性, pH/SG 耐性を有するが過りの腐性を示す
0.1M トリス/マロン 酸塩 0.3M TEB pH6.8	この系について可能な最良の組合せ
0.2M クエン酸塩 0.3M TEB pH7.1 45% エタノール	pH7.0を越えると緩衝能力なし
0.1M トリス/クエン 酸塩 0.3M TEB pH7.1	pH7.0を越えると緩衝能力なし

表 II

血液濃度 (mg/dL)	50℃で4週間		期待値 (SSD単位)
	ヘマ ス ス ス	本発明 試験手段	
0	10	10	10
0.018	10	18	20
0.045	18	28	30
0.135	28	38	40

SSD単位は種々の色ブロックレベルに使用される一連の任意単位であり、陰性を10として読み、漸進レベルは10単位ずつ増加する。

実施例5：騒音

目視により読み取りが行なわれる試験結果の定量化における問題点の1つは色覚の個人差である。この差は、色をL^{*}, a^{*}, b^{*}の三次元目盛で測定するニューヨーク州ニューバーグのコルモゲン社(Kollmorgen Corp., Newburgh, N.Y.)から入手可能であるマクベス(MacBeth) 1500比色計の使用により排除される。L^{*}, a^{*}, b^{*}値は色の明瞭な表示を可能にする。色が類似している場

合はL^{*}, a^{*}, b^{*}の値はそれぞれ等しくなり、これらの値の1つ以上が異なる場合は、色が異なることを示す。

実施例4：安定性

実施例1の好ましい試験具用配合物を以下の実験に使用し、試験具の無類な熱安定特性を証明した。下記に示した安定性のデータ(表II)はインディアナ州、エルクハートのマイルス・ラボラトリー社のエイムズ・ディビジョンより市販されている潜血試験手段である、ヘマスチャックス(HENASTIX)試験試験片と本発明の試験具とを比較するものである。50℃の熱を4週間かけた後の本試験具の読み取り値は期待値に非常に近いのに対し、ヘマストックスの高い血液濃度読み取り値は一貫して低かった。

マイルスラボラトリー社インディアナ州、エルクハートのエイムズ・ディビジョンよりN-マールチスチャックスSG(N-MULTISTIX SG)として市販されている多種試験具上での潜血試験は、対照試料との反応後、試験片に60℃

の熱をかけながら、3日及び7日の間隔をおいてマクベスによる読み取り試験を行なった。得られたL^{*}, a^{*}, b^{*}値のグラフは一段階高い色ブロックへの移行を明らかに示した。熱応力を加えた後、陰性試料に浸漬した後の試験片の色は陰性試料よりも30mg/dLのヘモグロビン試料の期待色に近かった。同様に30mg/dL試料の色も100mg/dL試料から期待される色への明らかなる移行を示した。

先に使用したものと同様のグルコース試験手段(グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び沃化カリウム)と本発明の潜血試験手段を含む

マルチパッド試験片を用いて行なった同様のグラフは、60℃の熱を7日間かけた後室温で試験したところL², a², b²軸上での実質的移行は示されなかった。苛酷な熱をかけたにもかかわらず、陰性試料及び30mg/dL試料については、「線変」は認められなかった。

発明の精神からはなれない範囲で好ましい実施態様の修正及び変更を行なうことができる。